Autoxydation und Phenoloxydase-Oxydation des Hämatoxylins.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Ulrich Heinrichs

aus Berlin

~~1964~~

1965

Druck:

ERNST-REUTER-GESELLSCHAFT
der Förderer und Freunde der Freien Universität Berlin e.V.

DISSERTATIONS-DRUCKSTELLE

1 Berlin 33, Garystr. 45

Autoxydation und Phenoloxydase-Oxydation des Hämatoxylins.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Freien Universität Berlin

ACAD.
LUGD. BAT.
BIBL.

vorgelegt von

Ulrich Heinrichs

aus Berlin

1964

1. Referent: Priv.-Doz. Dr. K.-H. FRÖMMING
2. Referent: Prof. Dr. G. SCHENCK
Tag der mündlichen Prüfung: 11. DEZ. 1964
Tag der Promotion: 27. FEB. 1965

Diese Arbeit wurde im Pharmazeutischen Institut der Freien Universität in Berlin-Dahlem durchgeführt.

Die Arbeit entstand auf Anregung von Herrn Priv.-Doz. Dr. K.-H. FRÖMMING, dem ich für die Überlassung des Themas, die Förderung meiner wissenschaftlichen Weiterbildung und die Diskussion der Probleme, die bei der Durchführung der Untersuchungen auftraten, danke.

Herrn Professor Dr. G. SCHENCK bin ich für das Interesse, das er meiner Arbeit entgegenbrachte, zu aufrichtigem Dank verpflichtet.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547201_0016

Inhaltsverzeichnis

	Seite
A. Einleitung und Problemstellung	7
B. Experimenteller Teil	10
1. Manometrische Untersuchungen	10
a. Autoxydation des Hämatoxylins	10
b. Fermentative Oxydation des Hämatoxylins	13
2. Verteilungschromatographische Untersuchungen	15
a. Autoxydation des Hämatoxylins	15
b. Fermentative Oxydation des Hämatoxylins	16
c. Autoxydation des Hämateins	18
d. Fermentative Oxydation des Hämateins	18
3. Spektralphotometrische Untersuchungen	19
a. Ablauf der Reaktion bei pH 4,0	19
b. Ablauf der Reaktion bei pH 5,5	20
c. Ablauf der Reaktion bei pH 7,0	22
d. Einwirkung von Ascorbinsäure auf die fermentative Oxydation des Hämatoxylins	24
e. Einwirkung von Ascorbinsäure auf die fermentative Oxydation des Hämateins	27
4. Oxydationsprodukt Rf 0,12	30
C. Präparativer und analytischer Teil	31
1. Nichtfermentative Darstellung des Hämateins	31
2. Darstellung und Isolierung des ersten fermentativen Oxydationsproduktes	31
3. Abtrennung des Oxydationsproduktes Rf 0,12	32
4. Acetylierungen	33
D. Beschreibung der Versuche	38
1. Reinigung des Hämatoxylins	38
2. Darstellung der Phenoloxydase	38
3. Manometrische Messungen	39
4. Papierchromatographie	40
5. Dünnschichtchromatographie	40
6. Spektralphotometrie	41

Seite

7. IR-Spektralphotometrie 41
8. Molekulargewichtsbestimmung 41
9. Elementaranalyse 42

E. Zusammenfassung 43

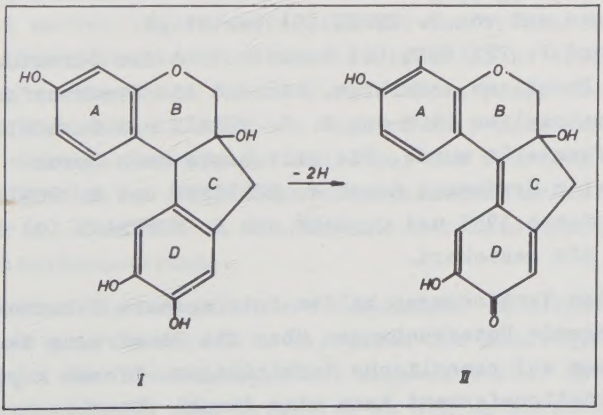
F. Literaturverzeichnis 45

A. Einleitung und Problemstellung

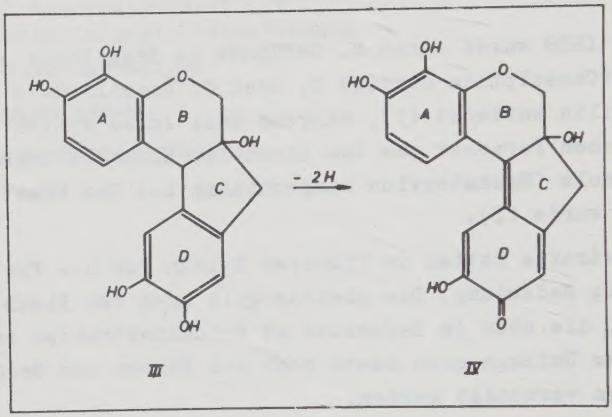
Im Jahre 1808 wurde durch M. CHEVREUL im Brasilholz oder Rotholz (Caesalpinia christa L. oder C. brasiliensis Sw.) das Brasilin entdeckt (1), während zwei Jahre später von dem gleichen Forscher aus dem Blauholz, Blutholz oder Campecheholz (Haematoxylon campechianum L.) das Hämatoxylin isoliert wurde (2).

Rotholzextrakte hatten in früheren Zeiten für die Färberei eine große Bedeutung. Das gleiche gilt auch für Blauholzextrakte, die aber im Gegensatz zu Rotholzextrakten in beschränktem Umfange auch heute noch zum Färben von Seiden und Pelzen verwendet werden.

Der farblose Hauptinhaltsstoff des Rotholzes ist das Brasilin (I), das durch Oxydation in das rotgefärbte Brasilein (II) übergeht.



Der farblose Hauptinhaltsstoff des Blauholzes ist das Hämatoxylin (III), das durch Oxydation in das rote Hämatein (IV) übergeht.



Die Summenformel $C_{16}H_{14}O_5$ für Brasilin wurde 1876 von C. LIEBERMANN und O. BURG vorgeschlagen (3). Die Hämatoxylin-Formel $C_{16}H_{14}O_6$ wurde 1842 von O. L. ERDMANN (4) vorgeschlagen und von O. HESSE (5) bestätigt.
A. WERNER und P. PFEIFFER (6) konnten 1904 die Strukturformel des Brasilins aufklären, während die Strukturformel des Hämatoxylins 1908 von W. H. PERKIN und R. ROBINSON (7) aufgestellt wurde. Sie gilt heute nach Durchführung zweier Synthesen durch F. MORSINGH und R. ROBINSON (8) im Jahre 1953 und O. DANN und H. HOFFMANN (9) im Jahre 1963 als gesichert.

Die genannten Verbindungen bilden interessante Substanzen für grundlegende Untersuchungen über die Einwirkung der Phenoloxydase auf phenolische Verbindungen. Dieses kupferhaltige Oxydationsferment kann eine Anzahl phenolischer Substanzen oxydieren; hierunter fallen monophenolische, 1,2-diphenolische und 1,2,3-triphenolische Stoffe (10,11,12).

Das Hämatoxylin und das Brasilin sind zwei Verbindungen, in denen nach unseren bisherigen Kenntnissen zwei Angriffspunkte des Enzyms vorliegen können. Das Hämatoxylin

(III) müßte theoretisch an den beiden o-Dihydroxygruppierungen oxydiert werden können, während das Brasilin (I) theoretisch an der o-Dihydroxygruppierung im Ring D und an der monophenplischen Gruppe im Ring A angegriffen werden müßte. Wie die Oxydation derartiger Verbindungen, deren Molekül an mehreren Stellen oxydierbar ist, abläuft, ist nicht bekannt.

Die vorliegende Arbeit sollte sich mit der fermentativen Oxydation des Hämatoxylins befassen. Da es sich bei dieser Substanz um eine sehr autoxydable Verbindung handelt, mußten bei diesen Untersuchungen auch gleichzeitig die Probleme der nichtfermentativen Oxydation behandelt werden. In Arbeiten, die sich mit dem Hämatoxylin befassen, wird allgemein auf die Tatsache hingewiesen, daß sich wäßrige Lösungen im Laufe der Zeit rötlich verfärben (13). Dieser Vorgang rührt von einer Autoxydation her, wobei als Oxydationsprodukt Hämatein (IV) gebildet wird.

Ob in dem frischen Holz auch mit einer fermentativen Veränderung der Verbindung gerechnet werden muß, kann nicht gesagt werden. In der Literatur ist das Vorkommen von Oxydationsfermenten im Blauholz bisher nicht beschrieben. In der vorliegenden Arbeit konnte diese Frage auch nicht geklärt werden, da es nicht möglich war, frisches Holz für derartige Versuche zu erhalten. Ein wäßriger Auszug der getrockneten Droge Lignum campechianum Erg.B.6 (Firma Caesar u. Lorentz K.G. Hilden-Rhld.) zeigte keine Phenoloxydase-Wirkung.

Theoretisch konnte nicht von vornherein vorausgesagt werden, ob eine fermentative Oxydation des Hämatoxylins das Hämatein als Oxydationsprodukt ergeben würde. Es müßte in der ersten Stufe eine Oxydation zu dem entsprechenden o-Chinon erwartet werden, wobei zunächst offenbleiben muß, ob die Oxydation am Ring A oder am Ring D angreift. Solche o-chinoiden Verbindungen bilden sich bei allen bisher bekannten Oxydationen diphenolischer Verbindungen, die durch Phenoloxydase initiiert werden.

B. Experimenteller Teil

1. Manometrische Untersuchungen

a. Autoxydation des Hämatoxylins

Schon F. REIM (14), P. ENGELS, W. H. PERKIN und R. ROBINSON (15) hatten in verschiedenen Arbeiten über das Hämatoxylin festgestellt, daß in wäßrigen Lösungen Hämatoxylin der Autoxydatin unterworfen ist. Diese Untersuchungen waren nur qualitativ durchgeführt worden. Um in einer vergleichenden Arbeit über die fermentative und nichtfermentative Oxydation exakte Aussagen machen zu können, mußten neben den fermentativen Untersuchungen auch qualitative und quantitative Messungen der Autoxydation durchgeführt werden, die das Ziel haben mußten, eine Abgrenzung beider Oxydationsvorgänge zu erreichen.

Manometrische Untersuchungen mittels der WARBURG-Technik in Abhängigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration ergaben das in Abb. 1 dargestellte Bild.

Wie zu erwarten, steigt die Autoxydation mit steigendem pH-Wert. Der gemessene Sauerstoffverbrauch war in den angegebenen Zeitabschnitten liniar. Unterhalb von pH 5,5 ist der Sauerstoffverbrauch innerhalb der beiden ersten Reaktionsstunden zu vernachlässigen. Das ist im Hinblick auf die durchzuführenden fermentativen Untersuchungen wichtig.

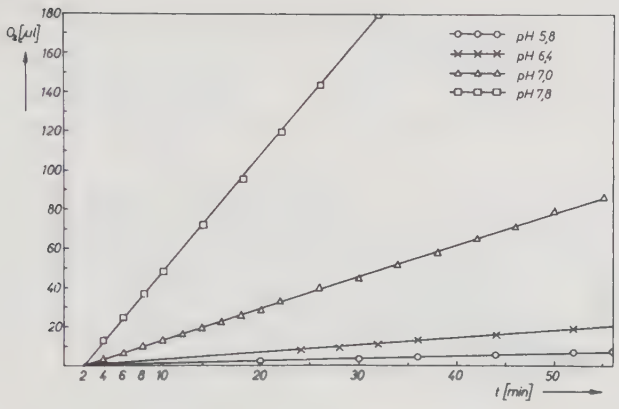


Abb. 1: Autoxydation des Hämatoxylins in der pH-Abhängigkeit

Hämatoxylin-Konzentration:
10 mg/5 ml Reaktionsansatz (= $6{,}6 \times 10^{-3}$m); 25°C

Es besteht ebenfalls eine Proportionalität zwischen Substratkonzentration und Sauerstoffverbrauch (Abb. 2).

Der Versuch, durch Zusatz von Aethylendiaminotetraessigsäure zum Reaktionsansatz eine infolge Vorhandenseins von Schwermetallspuren hervorgerufene oder katalysierte Autoxydation zu unterbinden, hatte keinen Erfolg. Hierbei wurde vielmehr eine Erhöhung des Sauerstoffverbrauchs festgestellt. Möglicherweise besteht hier eine Beziehung zu einfachen Fermentmodellen (16).

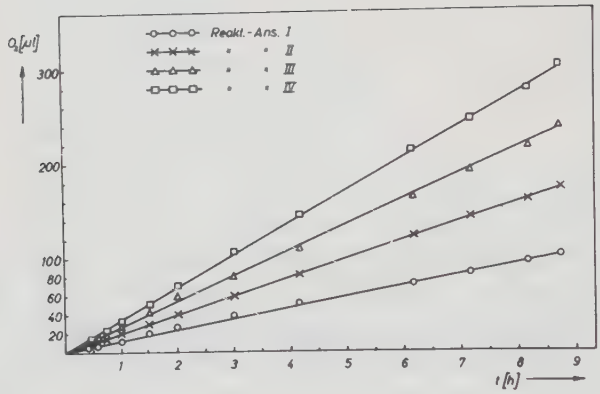


Abb. 2: Autoxydation des Hämatoxylins in Abhängigkeit von der Substratkonzentration

Hämatoxylin-Konzentration:

I : 5 mg/5 ml Reaktionsansatz (= $3{,}3 \times 10^{-3}$ m)

II : 10 mg/5 ml Reaktionsansatz (= $6{,}6 \times 10^{-3}$ m)

III : 15 mg/5 ml Reaktionsansatz (= $1{,}0 \times 10^{-2}$ m)

IV : 15 mg/5 ml Reaktionsansatz (= $1{,}0 \times 10^{-2}$ m)

Aethylendiaminotetraessigsäure-Konz. in Ansatz IV : 1 ml m/10 Lsg./5 ml Reaktionsansatz

pH 6,4; 25°C

b. Fermentative Oxydation des Hämatoxylins

Abhängigkeit von der Substratkonzentration

Die Untersuchungen wurden bei pH 5,5 vorgenommen. Unter den Versuchsbedingungen:
20 mg Hämatoxylin/5 ml Reaktionsansatz (= $1{,}33 \times 10^{-2}$m)
und 25°C
trat bei diesem pH keine Autoxydation auf. Die fermentativen Messungen ergaben mit steigender Substratkonzentration einen erhöhten Sauerstoffverbrauch (Abb. 3). Bei den Messungen mit 10, 15 und 20 mg Hämatoxylin pro 5 ml Reaktionsansatz entstand ein roter Niederschlag.

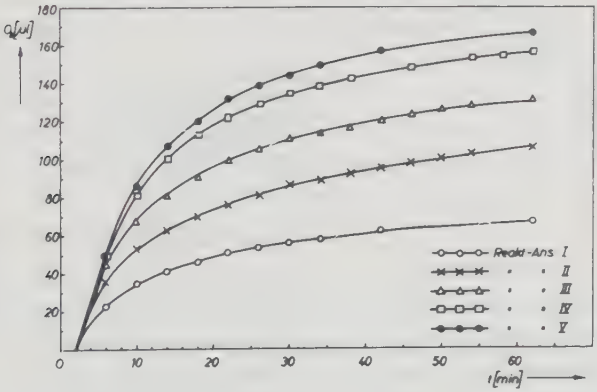


Abb. 3: Fermentative Oxydation des Hämatoxylins in Abhängigkeit von der Substratkonzentration

Hämatoxylin-Konzentration:
I : 2,5 mg/5 ml Reaktionsansatz (= $1{,}66 \times 10^{-3}$m)
II : 5,0 mg/5 ml Reaktionsansatz (= $3{,}3 \times 10^{-3}$m)
III : 10,0 mg/5 ml Reaktionsansatz (= $6{,}6 \times 10^{-3}$m)
IV : 15,0 mg/5 ml Reaktionsansatz (= $1{,}0 \times 10^{-2}$m)
V : 20,0 mg/5 ml Reaktionsansatz (= $1{,}33 \times 10^{-2}$m)
Fermentkonzentration: 0,5 ml (1:10)/5 ml Ansatz
pH 5,5; 25°C

pH-Abhängigkeit

Mit steigendem pH nimmt der Gesamtsauerstoffverbrauch (= fermentative Oxydation + Autoxydation) zu. Zieht man den der Autoxydation zu Grunde liegenden Sauerstoffverbrauch ab, so zeigt sich, daß bei pH 5,8 der fermentative Anteil der Oxydation größer ist als bei pH 7,0 (s. Abb. 4).

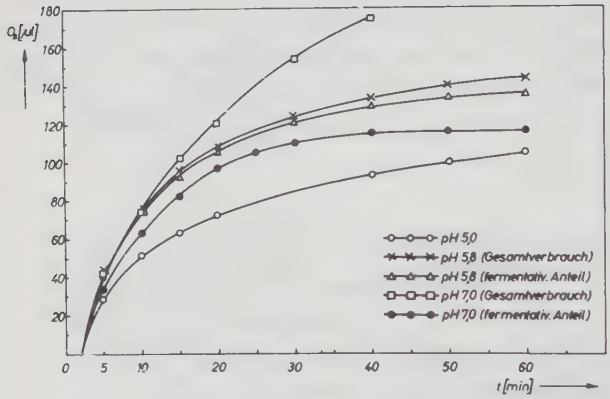


Abb. 4: pH-Abhängigkeit der fermentativen Oxydation des Hämatoxylins unter Berücksichtigung der Autoxydation

Hämatoxylin-Konzentration:
10 mg/5 ml Reaktionsansatz (= $6{,}6 \times 10^{-3}$m)
Ferment-Konzentration: 0,5 ml (1:10)/5 ml Ansatz
25°C

Dieses steht damit in Übereinstimmung, daß das pH-Optimum der Phenoloxydase im allgemeinen bei pH-Werten zwischen 5,5 und 6,5 liegt.

Mit Sicherheit läßt sich aus diesen Untersuchungen schließen, daß Hämatoxylin nicht nur autoxydativ, sondern auch fermentativ oxydiert werden kann. Diese Phenoloxydase-Oxydation tritt bereits in einem pH-Bereich ein, in dem noch keine oder eine nur sehr geringe Autoxydation erfolgt.

2. Verteilungschromatographische Untersuchungen

a. Autoxydation des Hämatoxylins

Papierchromatographisch bzw. dünnschichtchromatographisch wurde der Verlauf der nichtfermentativen Oxydation des Hämatoxylins verfolgt. Die Reaktionsansätze, die 10 mg Hämatoxylin/10 ml Puffer enthielten, wurden nach verschiedenen Zeiten entnommen und zur Chromatographie direkt auf das Papier bzw. auf die Platte aufgetragen. Als Fließmittel wurde jeweils Butanol/Eisessig/Wasser (4+1+1) verwendet.

Oxydation unterhalb von pH 4,5

Unterhalb pH 4,5 war innerhalb von 24 Stunden kein Oxydationsprodukt nachzuweisen. Bei längeren Untersuchungen zeigte sich ein Oxydationsprodukt mit dem Rf-Wert 0,33.

Oxydation zwischen pH 4,5 und pH 7,0

Die Bildungsgeschwindigkeit des Oxydationsproduktes mit dem Rf-Wert 0,33 nimmt mit steigendem pH-Wert zu. Diese Substanz konnte durch papierchromatographischen Vergleich und durch Isolierung als Hämatein nachgewiesen werden (s. Abschn. C 1).

Bei pH 6,4 kann nach 24 Stunden neben Hämatoxylin und Hämatein auch ein gelbgrüner Fleck (Rf-Wert 0,12) nachgewiesen werden. Nach weiteren 24 Stunden ist bei diesem pH-Wert alles Hämatoxylin verschwunden. In der gleichen Zeit ist ein grünblau fluorescierender Stoff (Rf-Wert 0,57) gebildet worden. Nach insgesamt 175 Stunden kann

Hämatein noch immer nachgewiesen worden. Die überwiegende Menge der aufgetragenen Substanz war nach dieser Zeit auf dem Startfleck sitzengeblieben. Sie bestand wahrscheinlich aus polymeren Folgeprodukten des Hämateins.

Oxydation bei pH 8,0

Ein gleicher, wenn auch wesentlich schnellerer Reaktionsablauf wurde bei pH 8,0 gefunden. Unmittelbar nach Beginn der Reaktion kann Hämatein (Rf-Wert 0,33) nachgewiesen werden. Nach insgesamt 12 Minuten haben sich zwei weitere Oxydationsprodukte gebildet:

1. ein gelber Stoff (Rf-Wert 0,12)
2. ein grünblau fluorescierender Stoff (Rf-Wert 0,57).

Unter den angegebenen Versuchsbedingungen war das Hämatoxylin nach 15 Minuten vollständig oxydiert.

Oxydation bei pH 10,0

Bei pH 10,0 verläuft die Oxydation anders. Es kann mit Sicherheit innerhalb der gleichen Reaktionszeit nur Hämatein als Oxydationsprodukt nachgewiesen werden. Sowohl der Stoff mit dem Rf-Wert 0,12 als auch der mit 0,57 konnten nicht nachgewiesen werden. Auch nach 60 Minuten war überraschenderweise nicht alles Hämatoxylin oxydiert.

b. Fermentative Oxydation des Hämatoxylins

Eine Lösung von 10 mg Substrat in 10 ml Puffer pH 4,0 zeigte nach Zusatz von 6,4 mg Trockenferment (= 1 ml Stammfermentlösung) eine deutlich sichtbare Veränderung. Sie färbte sich rasch rötlichgelb und zeigte auf dem Papierchromatogramm, auf das sie direkt aufgetragen wurde, bereits nach einer Reaktionszeit von einer Minute die Bildung eines Fleckes mit dem Rf-Wert 0,33. Nach 15 Minuten konnte ein gelblicher Fleck (Rf-Wert 0,12) festgestellt werden. Die entsprechenden Rf-Werte bei den dünnschicht-

chromatographischen Untersuchungen waren 0,37 bzw. 0,25. Nach 20 Minuten war unter den angegebenen Versuchsbedingungen sämtliches Hämatoxylin oxydiert. Nach 150 Minuten war Hämatein nicht mehr nachzuweisen. Ein großer Teil der aufgetragenen Menge blieb nach dieser Zeit auf dem Startfleck sitzen. Die Reaktionsgeschwindigkeit, das heißt in diesem Falle das zeitliche Auftreten der beiden Flecke, nahm mit steigendem pH zu und verringerte sich mit fallender Fermentkonzentration.

Die beiden auftretenden Flecke scheinen mit den bei der Autoxydation gefundenen Flecken identisch zu sein.

Versuche bei pH 5,0 ergaben, daß bei geeigneter Wahl der Hämatoxylin-Konzentration Hämatein als Niederschlag ausfällt. Hierzu wurden 50 mg Hämatoxylin in 5 ml Puffer gelöst und mit 0,5 ml Stammfermentlösung versetzt. Hierbei läuft somit die Reaktion im wesentlichen im Sinne einer Bildung von Hämatein ab, das auf Grund seiner geringen Löslichkeit bei pH 5,0 ausfällt. Außerdem ergab der Versuch, daß ein zweites Oxydationsprodukt erst entsteht, wenn nahezu alles Hämatoxylin oxydiert ist.

Bei der unter gleichen Versuchsbedingungen ablaufenden Autoxydation konnte nach 50 Minuten ebenfalls Hämatein nachgewiesen werden. Nach 10 Stunden ist der überwiegende Teil des Hämatoxylins jedoch noch nicht oxydiert. Ein zweites Oxydationsprodukt konnte im beschriebenen Zeitabschnitt nicht festgestellt werden. Hämatein fällt hierbei innerhalb der Versuchszeit nicht aus.

Durch den fermentativen Ansatz ist bereits ein Hinweis auf eine präparative Darstellung des ersten fermentativen Oxydationsproduktes gegeben. Durch geeignete Wahl der Konzentration des Hämatoxylins ist es möglich, das Oxydationsprodukt auf Grund seiner geringen Löslichkeit als Niederschlag zu erhalten (s. Abschn. C 2).

Bei stärker alkalischen Werten wurde die fermentative Oxydation nicht untersucht, da hierbei der Einfluß der Autoxydation zu stark wird.

c. Autoxydation des Hämateins

1 mg Hämatein wurden jeweils in 1 ml Methanol gelöst und mit Puffer pH 7,0 bzw. 8,0 auf 10 ml verdünnt. Bei pH 8,0 konnte bereits nach 30 Minuten ein Fleck mit dem Rf-Wert 0,12 gefunden werden. Dieser trat bei pH 7,0 erst nach 20 Stunden auf. Hämatein war bei pH 8,0 nach 24 Stunden verschwunden, bei pH 7,0 erst nach 150 Stunden. Weiterhin entstand ein grünblau fluorescierender Stoff (Rf-Wert 0,57), und zwar bei pH 8,0 nach 20 und bei pH 7,0 nach ca. 70 Stunden. Nach 300 Stunden ist dieser nur noch bei pH 7,0 nachzuweisen. Der überwiegende Teil der aufgetragenen Substanz bleibt nach dieser Reaktionszeit auf dem Startfleck sitzen. In beiden pH-Bereichen ist noch der Stoff mit dem Rf-Wert 0,12 vorhanden.

Diese Versuche beweisen, daß es sich bei den Flecken, die außer Hämatein auch bei der Autoxydation des Hämatoxylins gefunden wurden, um Oxydationsprodukte des Hämateins handeln muß.

d. Fermentative Oxydation des Hämateins.

Die fermentative Oxydation des Hämateins, die bei pH 4,0 untersucht wurde, zeigte papierchromatographisch das gleiche Ergebnis wie die des Hämatoxylins. 1 mg Hämatein, in 1 ml Methanol und 9 ml Puffer gelöst, wurden nach Zusatz von 0,1 ml Stammfermentlösung in 150 Minuten vollständig oxydiert. Es wird ebenfalls ein Fleck mit dem Rf-Wert 0,12 gebildet.

Man kann somit feststellen, daß sowohl die fermentative als auch die nichtfermentative Oxydation des Hämateins analog der Oxydation des Hämatoxylins verläuft. Die fermentative Oxydation beider Substanzen unterscheidet sich, abgesehen von der Reaktionsgeschwindigkeit, von der nichtfermentativen dadurch, daß ein grünblau fluorescierender Fleck (Rf-Wert 0,57) nicht nachzuweisen ist.

Es sei noch auf folgende Beobachtung bei diesen Versuchen hingewiesen:

Hämatein ist auf dem Papierchromatogramm von einem Fleck mit dem Rf-Wert 0,35 begleitet, der gelblich fluoresciert und mit dem Verschwinden von Hämatein ebenfalls nicht mehr nachzuweisen ist. Diese Beobachtung ist möglicherweise auf eine Gleichgewichtsreaktion von Hämatein mit Dihydrohämateinol zurückzuführen (s. Abschn. B 3 e).

3. Spektralphotometrische Untersuchungen

Wie die manometrischen und verteilungschromatographischen Messungen sollten auch die spektralphotometrischen Untersuchungen Aufschluß über die Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit vom jeweiligen pH-Wert, darüber hinaus aber auch einen weiteren Vergleich über den Ablauf der Autoxydation und der fermentativen Oxydation geben.

a. Ablauf der Reaktion bei pH 4,0

Autoxydation

Wie aus Abb. 5 ersichtlich, findet innerhalb von 100 Std. nur eine geringfügige Änderung des Absorptionsspektrums des Hämatoxylins statt, was auf eine sehr geringe Autoxydation schließen läßt. Es deutet sich die Ausbildung eines schwachen Maximums zwischen 445 nm und 450 nm an.

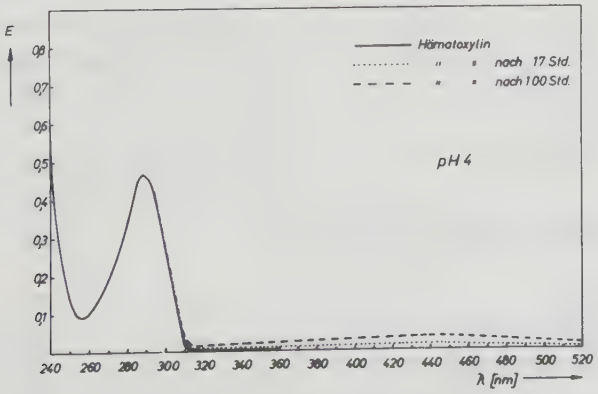


Abb. 5: Autoxydation des Hämatoxylins bei pH 4,0
Hämatoxylin-Konzentration: $1{,}0 \times 10^{-4}$ m
20°C

Fermentative Oxydation:

Es kann eine, wenn auch bei der verwendeten Fermentkonzentration geringe, Oxydation festgestellt werden. Bei 445 nm wird ein neues Maximum gebildet (Abb. 6). Der übrige Verlauf der Kurve bleibt unverändert. Das entstehende Maximum ist auf die Bildung von Hämatein zurückzuführen (17).

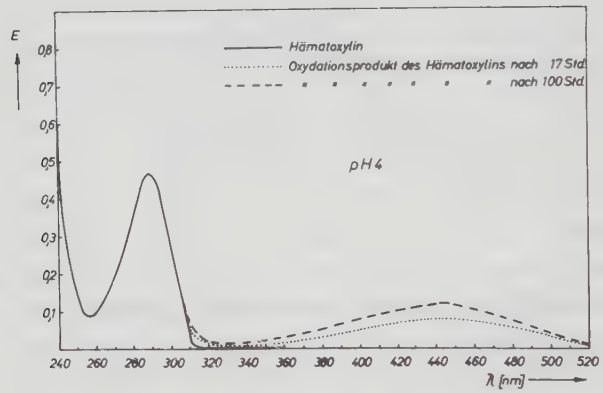


Abb. 6: Fermentative Oxydation des Hämatoxylins bei pH 4,0
Hämatoxylin-Konzentration: $1,0 \times 10^{-4}$ m
Fermentkonzentration: 0,05 ml(1:10)/10 ml Reaktionsansatz
20°C
Die Autoxydation ist nicht berücksichtigt.

b. Ablauf der Reaktion bei pH 5,5

Autoxydation:

Aus den Kurven in Abb. 7 ist deutlich eine Autoxydation zu ersehen. Sie ist jedoch relativ gering. Nach 100 Stunden findet immer noch ein Ansteigen des entstehenden neuen Maximums bei 445 nm statt (Hämatein-Maximum). Im UV-Bereich ist keine Veränderung eingetreten.

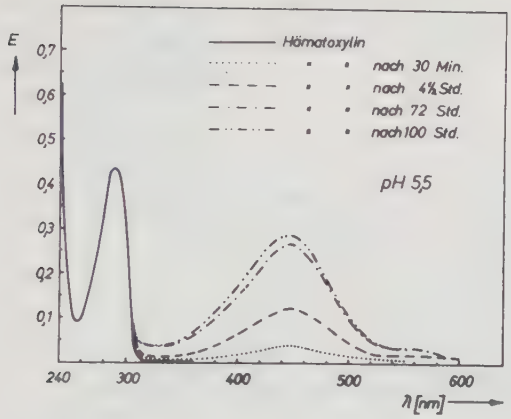


Abb. 7: Autoxydation des Hämatoxylins bei pH 5,5
Hämatoxilin-Konzentration: $1,0 \times 10^{-4}$ m
20°C

Fermentative Oxydation:

Sofort nach Fermentzugabe findet eine deutliche Veränderung des Spektrums statt (Abb. 8). Die nach 4 Minuten aufgenommene Kurve entspricht etwa der der Autoxydation nach 100 Stunden. Das neue Maximum bei 445 nm wird während der Oxydation in den kurzwelligen Bereich verschoben. Nach 100 Stunden hat sich ein neues Maximum bei 388 nm gebildet. Eine weitere Veränderung im Kurvenablauf findet nicht statt.

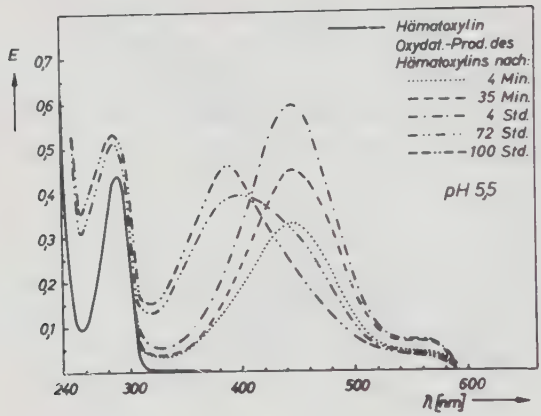


Abb. 8: Fermentative Oxydation des Hämatoxylins bei pH 5,5
Hämatoxylin-Konzentration: $1,0 \times 10^{-4}$ m
Fermentkonzentration: 0,05 ml(1:10)/10 ml Reaktionsansatz
20°C
Die Autoxydation ist nicht berücksichtigt.

c. Ablauf der Reaktion bei pH 7,0

Autoxydation:

Aus den Kurven in Abb. 9 ist zu ersehen, daß innerhalb der ersten Reaktionsstunde ein ausgeprägtes Maximum bei 562 nm gebildet wird. Nach den Untersuchungen von B. J. MAC NULTY und G. J. HUNTER muß dieses Maximum auf die Bildung des Hämateins zurückgeführt werden. Die genannten Autoren fanden bei ihren Untersuchungen bei pH 7,2 die Ausbildung eines Hämatein Maximums bei 562 nm (18). Nach ca. 9 Stunden wird das Hämatein-Maximum (562 nm) wieder abgebaut. Im Laufe der weiteren Oxydation entsteht daneben ein zweites Maximum, das allmählich in den kurzwelligen Bereich bis 390 nm verschoben wird. Diese Beobachtung wurde ebenfalls schon von B. J. MAC NULTY und G. J. HUNTER (19) und

und G. C. LALOR und S. L. MARTIN (20) gemacht. Im UV-Bereich findet gleichfalls eine Veränderung statt. Das ursprüngliche Maximum bei 290 nm ist nach ca. 29 Stunden nach 280 nm verschoben.

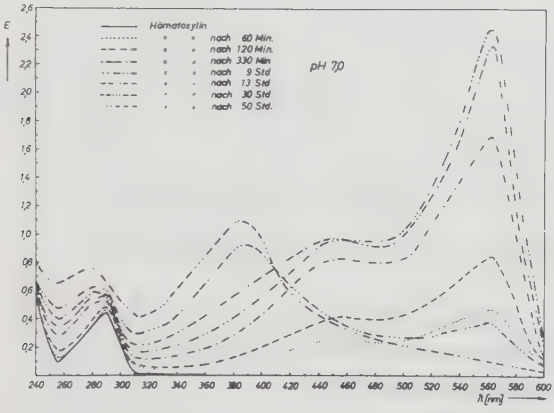


Abb. 9: Autoxydation des Hämatoxylins bei pH 7,0
Hämatoxylin-Konzentration: $1{,}0 \times 10^{-4}$ m
20°C

Fermentative Oxydation:

Der fermentative Reaktionsablauf verläuft entsprechend der Autoxydation (Abb. 10). Allerdings ist die Reaktionsgeschwindigkeit erheblich größer als bei der nichtfermentativen Oxydation. Unter den angegebenen Versuchsbedingungen ist bei der fermentativen Oxydation das Maximum bei 562 nm nach etwa 20-stündiger Reaktion gegenüber 50 Stunden bei der Autoxydation nicht mehr nachzuweisen. Selbstverständlich hängen diese zeitlichen Werte von der Fermentkonzentration ab.

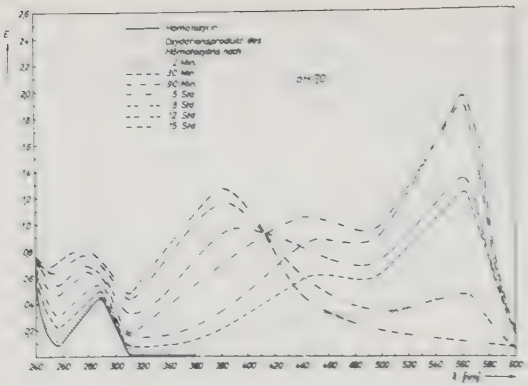
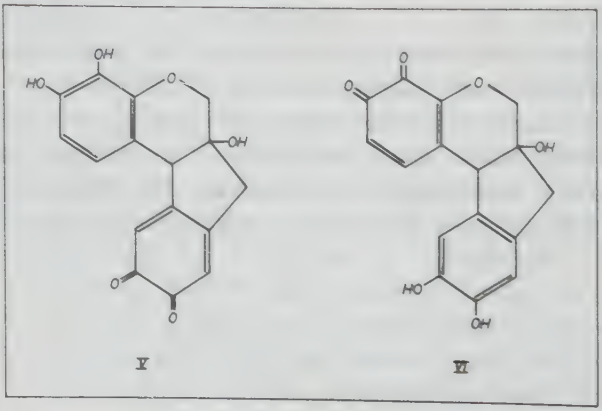


Abb. 10: Fermentative Oxydation des Hämatoxylins bei pH 7,0

Hämatoxylin-Konzentration: $1,0 \times 10^{-4}$ m
Fermentkonzentration: 0,05 ml(1:10)/10 ml
Reaktionsansatz; 20°C
Die Autoxydation ist nicht berücksichtigt.

d. Einwirkung von Ascorbinsäure auf die fermentative Oxydation des Hämatoxylins

Das primäre Oxydationsprodukt bei der fermentativen Oxydation des Hämatoxylins kann nicht das Hämatein direkt sein. Als Oxydationsprodukt war entweder das Chinon V oder das Chinon VI zu erwarten.



Es war eine andere Frage, inwieweit aus Stabilitätsgründen das gebildete o-Chinon in einem nichtfermentativen Schritt in die stabilere mesomere Form des Hämateins (IV) übergeht. Zur Beweisführung, daß bei der fermentativen Oxydation des Hämatoxylins eines der beiden o-Chinone (V oder VI) gebildet wird, wurde den fermentativen Ansätzen als Reduktionsmittel Ascorbinsäure zugesetzt. Der Reaktionsablauf wurde spektralphotometrisch verfolgt. Hierfür boten sich zwei charakteristische Wellenlängen an:

1. Die Abnahme der Absorption im Maximum der Ascorbinsäure bei 265 nm.
2. Die Bildung eines neuen Maximums bei 445 nm (= Hämatein).

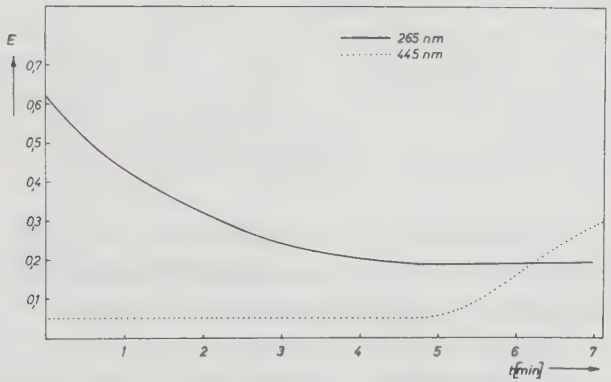


Abb. 11: Absorbtionsänderungen bei 265 nm und 445 nm

Hämatoxylin-Konzentration: $0{,}5 \times 10^{-4}$ m
Ascorbinsäure-Konzentration: $0{,}25 \times 10^{-4}$ m
Fermentkonzentration: 0,1 ml(1:5)/5 ml Reaktionsansatz; pH 5,0; 20°C

Bei diesen Untersuchungen, die bei pH 5,0 durchgeführt wurden, konnten drei wesentliche Ergebnisse erhalten werden:

1. Unter den gegebenen Versuchsbedingungen konnte innerhalb von 5 Minuten eine laufende Abnahme der Absorption bei 265 nm festgestellt werden (Abb. 11).
2. Mit Beendigung der Abnahme der Absorption der Ascorbinsäure bei 265 nm setzte die Bildung des neuen Maximums

bei 445 nm ein (Abb. 11).

3. Das unmittelbar nach Beendigung der Ascorbinsäure-Oxydation erhaltene Spektrum ist identisch mit dem Spektrum des Hämatoxylins (Abb. 12).

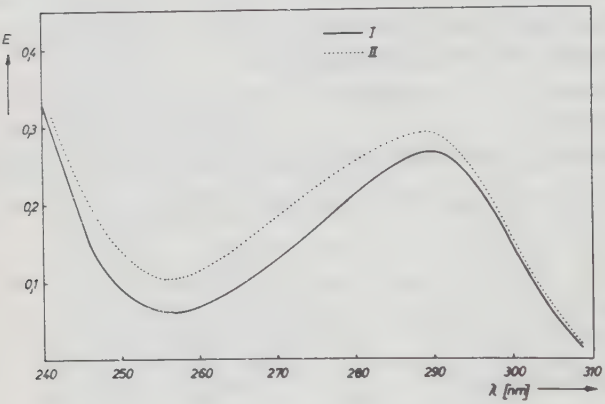


Abb. 12: Fermentative Oxydation des Hämatoxylins in Anwesenheit von Ascorbinsäure

I : Hämatoxylin $0{,}5 \times 10^{-4}$ m

II : Spektrum nach der Oxydation der Ascorbinsäure (Konz. s. Abb. 11)

pH 5,0; 20°C

Welche Folgerungen ergeben sich hieraus? Die Abnahme des Ascorbinsäure-Maximums bei 265 nm ist der Beweis für die Ausbildung eines Redoxsystems, bei dem ein chinoides Oxydationsprodukt des Hämatoxylins in nichtfermentativer Reaktion die Ascorbinsäure zur Dehydroascorbinsäure oxydiert. Ascorbinsäure allein wird von der Phenoloxydase nicht oxydiert (21).

Die Ausbildung eines normalen Reoxsystems

$$\text{Hämatoxylin} + 1/2\ O_2 \xrightarrow[-H_2O]{(\text{Ferment})} \text{Hämatoxylinchinon (V od. VI)}$$

$$\text{V od. VI} + \text{Ascorbinsäure} \longrightarrow \text{Hämatoxylin} + \text{Dehydroascorbinsäure}$$

wird auch dadurch bewiesen, daß das Spektrum unmittelbar nach der völligen Oxydation der Ascorbinsäure dem Spektrum des Hämatoxylins gleicht (Abb. 12). Erst danach läuft die Reaktion weiter, wobei als erstes faßbares Folgeprodukt das Hämatein gebildet wird.

Das primäre Oxydationsprodukt kann nicht mit dem Hämatein identisch sein, da Ascorbinsäure nicht in der Lage ist, Hämatein zu reduzieren. Es kann sich also nur um das Chinon V oder VI handeln.

Die hier beobachteten Reaktionen sind rein fermentativer Art, da in einem Vergleichsansatz ohne Fermentzusatz in dem System Hämatoxylin/Ascorbinsäure keine Reaktion erfolgte.

Die Untersuchungen im System Ferment/Hämatoxylin/Ascorbinsäure wurden ebenfalls bei pH 4,0 durchgeführt. Die Reaktion lief wie bei pH 5,0 ab, nur zeigte sich hierbei erwartungsgemäß eine langsamere Oxydationsgeschwindigkeit.

e. Einwirkung der Ascorbinsäure auf die fermentative Oxydation des Hämateins

In einem dem Abschnitt d analogen Versuch wurde das Substrat Hämatoxylin durch Hämatein ersetzt. Hierbei sollte festgestellt werden, ob Hämatein ebenfalls vom Ferment angegriffen wird, und ein gebildetes Oxydationsprodukt Ascorbinsäure zu oxydieren in der Lage ist. Diese Reaktion konnte bei drei Wellenlängen verfolgt werden:

1. Abnahme der Absorption im Maximum der Ascorbinsäure bei 265 nm.
2. Abnahme der Absorption im Maximum des Hämateins bei 445 nm nach Beendigung der Reaktion 1.
3. Bildung eines neuen Maximums bei ca. 388 nm (s. Abschnitt 3b und 3c).

Es wurden folgende Ergebnisse erhalten (Abb. 13 und 14):

1. Innerhalb der ersten 17 Minuten fand unter den gegebenen Versuchsbedingungen eine Abnahme der Absorption bei 265 nm statt.

2. Innerhalb dieser Zeit konnte nur eine sehr geringe Absorptionsverminderung bei 445 nm festgestellt werden. Danach wurde eine rasche Abnahme gemessen (Abb. 13).

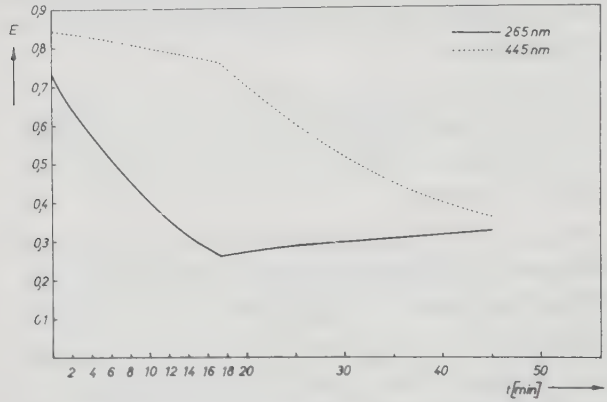


Abb. 13: Absorptionsänderung bei 265 nm und 445 nm

Hämatein-Konzentration: $0,5 \times 10^{-4}$ m
Ascorbinsäure-Konzentration: $0,25 \times 10^{-4}$ m
Fermentkonzentration: 0,1 ml(1:5)/5 ml Ansatz
pH 5,0; 20°C

3. Im Laufe der Reaktion wurde ein neues Maximum bei 388 nm gebildet (Abb. 14).
4. Nach Beendigung der Ascorbinsäure-Oxydation ist das erhaltene Spektrum identisch mit dem Spektrum des Hämateins (Abb. 14).

Aus diesen Beobachtungen können folgende Schlüsse gezogen gezogen werden:
Da während der Ascorbinsäure-Oxydation (= Abnahme des Maximums bei 265 nm) das Hämatein-Maximum (445 nm) erhalten bleibt, muß unter Ausbildung eines Redoxsystems die Ascorbinsäure zur Dehydroascorbinsäure oxydiert worden sein. Es ist aber nicht mit Sicherheit zu sagen, ob hierbei der Ring A des Hämateins allein oxydiert wird. Es muß hierbei das Gleichgewicht berücksichtigt werden, das zwischen Hämatein und Dihydrohämateinol besteht und von der vorhandenen Wasserstoffionenkonzentration abhängig ist (22).

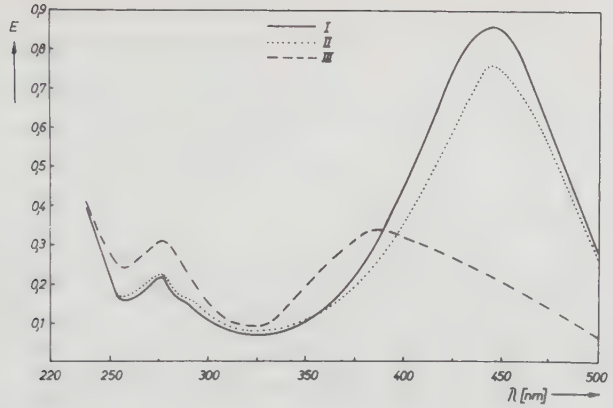


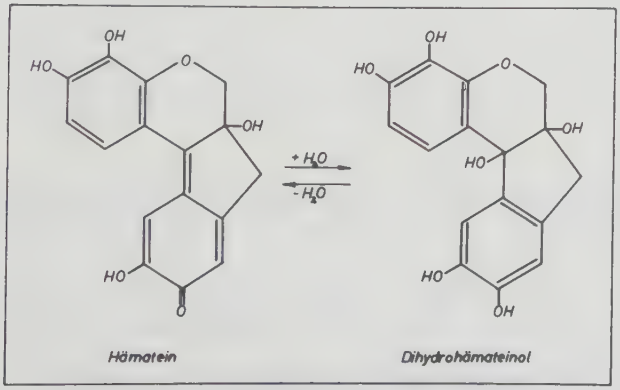
Abb. 14: Fermentative Oxydation des Hämateins in Anwesenheit von Ascorbinsäure

I : Hämatein $0,5x10^{-4}$m

II : Spektrum nach der Oxydation der Ascorbinsäure (Konz. s. Abb. 13)

III : Spektrum 80 Minuten nach Beginn der Oxydation

pH 5,0; 20°C



Es muß also angenommen werden, daß in wäßriger Lösung das Hämatein zum Teil in Dihydrohämateinol umgewandelt wird, so

daß in der Lösung nicht nur reines Hämatein, sondern ein Gemisch mit Dihydrohämateinol vorliegt. Es muß somit damit gerechnet werden, daß auch das Dihydrohämateinol oxydiert wird, wobei als fermentative Angriffspunkte die beiden o-Dihydroxygruppen zur Verfügung stehen.

4. Oxydationsprodukt Rf 0,12

Mit Hilfe eines größeren Reaktionsansatzes wurde versucht, das bei der Oxydation des Hämatoxylins gebildete weitere Oxydationsprodukt, das papierchromatographisch (Butanol/Eisessig/Wasser 4+1+1) einen Rf-Wert von 0,12 hat, abzutrennen. Mittels säulenchromatographischer Verteilung an einer Cellulosesäule gelang es, nur eine sehr geringe Menge dieser Verbindung abzutrennen, die nur die Aufnahme eines Absorptionsspektrums erlaubte (Abb. 15). Dieses zeigte ein Maximum bei 380 nm, und scheint somit verantwortlich zu sein für das bei den spektralphotometrischen Untersuchungen festgestellte Maximum bei 380 bis 388 nm (s. Abschnitt 3b und 3c).

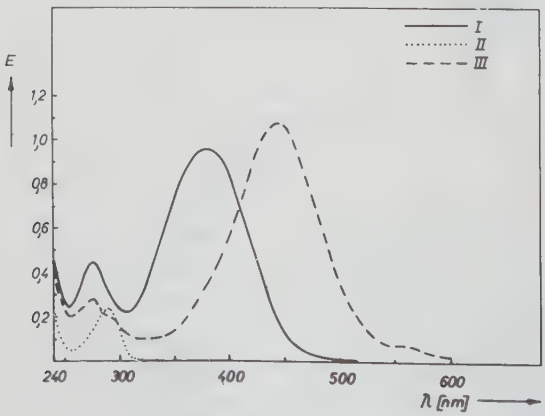


Abb. 15: I : Spektrum vom Oxydationsprodukt Rf 0,12
II : Hämatoxylinspektrum ($1,0 \times 10^{-4}$ m)
III : Hämateinspektrum ($1,0 \times 10^{-4}$ m)
pH 5,0

C. Präparativer und analytischer Teil

1. Nichtfermentative Darstellung des Hämateins

Die nichtfermentative Darstellung des Hämateins, das als Vergleichspräparat benötigt wurde, erfolgte aus Hämatoxylin durch Oxydation mittels Luftsauerstoff in ammoniakalischer Lösung nach einer Methode von P. ENGELS, W. H. PERKIN und R. ROBINSON (15).

6,0 g Hämatoxylin (E. MERCK A. G. Darmstadt) wurden in einem Gemisch von 6 ml konzentriertem Ammoniak und 60 ml Wasser gelöst. In die durch Eis gekühlte Lösung wurde über einen Zeitraum von 6 Stunden ein rascher Luftstrom geleitet. Danach wurde die Lösung in einem dünnen Strahl und unter Rühren in 100 ml 10%-ige Essigsäure, die zuvor zum Sieden erhitzt worden war, gegossen. Beim langsamen Abkühlen bildete sich ein voluminöser Niederschlag. Dieser wurde gesammelt und mit 2%-iger Essigsäure, Wasser und Methanol gewaschen. Zur Reinigung der Substanz wurde anschließend nach derselben Methode noch einmal umgefällt und im Exsikkator über konzentrierter Schwefelsäure getrocknet. Das erhaltene Hämatein sah braunrot aus und zersetzte sich beim Erhitzen bei ca. 250°C. Die Ausbeute betrug 25%.

Zur Bestimmung der Analysendaten wurde die Verbindung in das Acetylderivat übergeführt (s. Abschn. C4).

2. Darstellung und Isolierung des ersten fermentativen Oxydationsproduktes

Verfahren a:

5,0 g Hämatoxylin wurden in 1000 ml Puffer pH 5,0 gelöst und mit 250 mg Trockenferment oxydiert. Nach 60 Minuten wurde das Ferment durch einen Zusatz von 1000 ml Methanol inhibiert. Die Lösung wurde im Vakuum eingedampft und das gebildete Oxydationsprodukt durch Lösen in 2,5%-igem

Ammoniak und anschließender Fällung mit 80 ml 10%-iger Essigsäure (80°C) isoliert. Dieses Verfahren hatte den Nachteil, daß durch die kurzfristige alkalische Reaktion eine Autoxydation erfolgen kann. Daher wurde eine weitere Methode entwickelt.

Verfahren b:

Es wurde von der relativ guten Löslichkeit des Hämatoxylins (über 2%) und der Schwerlöslichkeit des Hämateins (0,06%) in Wasser Gebrauch gemacht.

Es wurden 4,0 g Hämatoxylin in 200 ml Puffer pH 4,8 gelöst. Je 100 ml wurden für die fermentative Oxydation und die Autoxydation (als Vergleich) vorgesehen. Durch beide Lösungen wurde mittels einer Pumpe ein rascher Luftstrom geleitet. Die mit 100 mg Phenoloxydase versetzte Lösung verfärbte sich sofort. Ein sich bildender Niederschlag wurde nach 2 Stunden gesammelt, mit 2%-iger Essigsäure, Wasser und Methanol gewaschen und getrocknet. Die Ausbeute betrug 20%. In der zweiten Lösung entstand in der gleichen Zeit kein Niederschlag. Sie wurde nur schwach gefärbt.

Zur Bestimmung der Analysendaten wurde die Verbindung in das Acetylderivat übergeführt (s. Abschn. C4).

3. Abtrennung des Oxydationsproduktes Rf 0,12

Verfahren a:

100 mg Hämatoxylin wurden in 100 ml Puffer pH 4,8 gelöst und nach Zusatz von 10 mg Trockenferment 120 Minuten geschüttelt. Anschließend wurde im Umlaufverdampfer eingeengt und im Verhältnis 4+1 mit Butanol und Eisessig verdünnt, so daß die Lösung anschließend ein Verhältnis 4+1+1 an Butanol/Eisessig/Wasser hatte. Diese Lösung wurde auf eine Cellulosesäule gebracht (Durchmesser 40 mm) und mit dem gleichen Fließmittel im Fraktomaten aufgetrennt. Die einzelnen Fraktionen wurden anschließend papierchromatographisch identifiziert. Hierbei konnte festgestellt wer-

den, daß eine Auftrennung in Hämatein und zweites Oxydationsprodukt stattgefunden hatte.

Das für die Auftrennung verwendete Whatman Cellulosepulver wurde folgendermaßen vorbereitet:

50 g Cellulosepulver wurden mit 100 ml Wasser 48 Stunden quellen gelassen. Danach wurde mit 400 ml Butanol und 100 ml Eisessig verdünnt und die Anschlemmung gleichmäßig in die Säule eingefüllt. Anschließend wurde die Säule mit dem Fließmittel gewaschen.

Verfahren b:

Es wurde zunächst wie oben verfahren. Der eingeengte Reaktionsansatz wurde anschließend auf einer Säule (Cellulosepulver SS 123, Schleicher und Schüll) mit Wasser chromatographiert. Auch hier ergab die Papierchromatographie den Nachweis einer Auftrennung.

4. Acetylierungen

In einem Vorversuch wurde die Acetylierung des Hämatoxylins durchgeführt, um die Veresterung der tertiären alkoholischen Gruppe zu überprüfen. Es zeigte sich, daß bei der Acetylierung mit Pyridin/Essigsäureanhydrid ein Pentaacetat gebildet wird. Der Schmelzpunkt der weißen Kristalle betrug 168°C (Literatur 165-166°C).

$C_{26}H_{24}O_{11}$ (512,5) Ber. C 60,94 H 4,69 Acetyl 41,9
Gef. C 60,36 H 4,74 Acetyl 40,2

Hierbei wird also die tertiäre alkoholische Gruppe mitacetyliert.

Abb. 16: IR-Spektrum von Hämatoxylin-pentaacetat

Arbeitsvorschrift:

300 mg Hämatoxylin wurden in 5 ml über Bariumoxyd getrocknetem Pyridin gelöst und mit einem fünffachen Überschuß Essigsäureanhydrid versetzt. Nach sechsstündiger Reaktionszeit in der Kälte wurde die Lösung mit 20 ml Äther verdünnt und anschließend mehrmals mit Wasser gewaschen. Danach wurde das Pyridin mit 2%-iger Salzsäure und nicht umgesetztes Phenol mit 0,5%-iger Natronlauge ausgeschüttelt. Der mit Wasser nachgewaschene und über Natriumsulfat getrocknete Äther wurde abgedampft, und das erhaltene Acetylierungsprodukt aus 25%-igem Methanol umkristallisiert.

Mittels Essigsäureanhydrid/Pyridin wurde das auf nichtfermentativem Wege erhaltene Oxydationsprodukt, bei dem es sich um Hämatein handeln sollte, und das erste fermentativ erhaltene und isolierte Oxydationsprodukt, das ebenfalls Hämatein sein sollte, acetyliert. Unter der Annahme, daß die im Hämatein vorliegenden vier Hydroxylgruppen acetyliert werden, mußten folgende Analysendaten für das erhaltene Tetraacetat erwartet werden:

$C_{24}H_{20}O_{10}$ (468,40) Ber. C 61,54 H 4,30 CH_3CO 36,76
Es wurden jedoch folgende Daten erhalten:
(551,20) Gef. C 58,78 H 4,72 CH_3CO 40,77

Hieraus läßt sich für die acetylierte Verbindung des Hämateins die Summenformel $C_{26}H_{24}O_{12}$ berechnen. Das Molekül muß fünf Acetylgruppen enthalten. Dieses ist aber nur möglich, wenn es sich hierbei um acetyliertes Dihydrohämateinol handelt, da Hämatein im Höchstfall ein Tetraacetat zu bilden vermag. Das ursprünglich vorliegende Hämatein muß somit vor oder während der Acetylierung in Dihydrohämateinol umgewandelt worden sein (s. Abschn. B3e). Diese Umlagerung ist nicht nur durch Kochen mit Laugen zu erreichen (23), sondern wird auch durch Säuren katalysiert (22).

Das IR-Spektrum zeigt, daß das Acetylderivat noch eine freie Hydroxylfunktion enthält (Abb. 17).

Das Acetylierungsprodukt des ersten fermentativen Oxydationsproduktes ist mit dem aus dem nichtfermentativ gewonnenen Hämatein identisch, wie aus den folgenden Gegenüberstellungen zu ersehen ist.

Dihydrohämateinol-pentaacetat

$C_{26}H_{24}O_{12}$	(528,45)	Ber.	C 59,09	H 4,58	CH_3CO 40,74
nichtferm.	(551,20)	Gef.	C 58,78	H 4,72	CH_3CO 40,77
ferm.	(546,40)		C 58,73	H 4,78	CH_3CO 40,67

Auch die IR-Spektren (Abb. 17) und UV-Spektren (Abb. 18) der Acetylierungsprodukte stimmen überein. x)

---

x) Wir danken Herrn Dr. N e u d e r t, Firma Schering A.G. Berlin, für die Aufnahme der IR-Spektren.

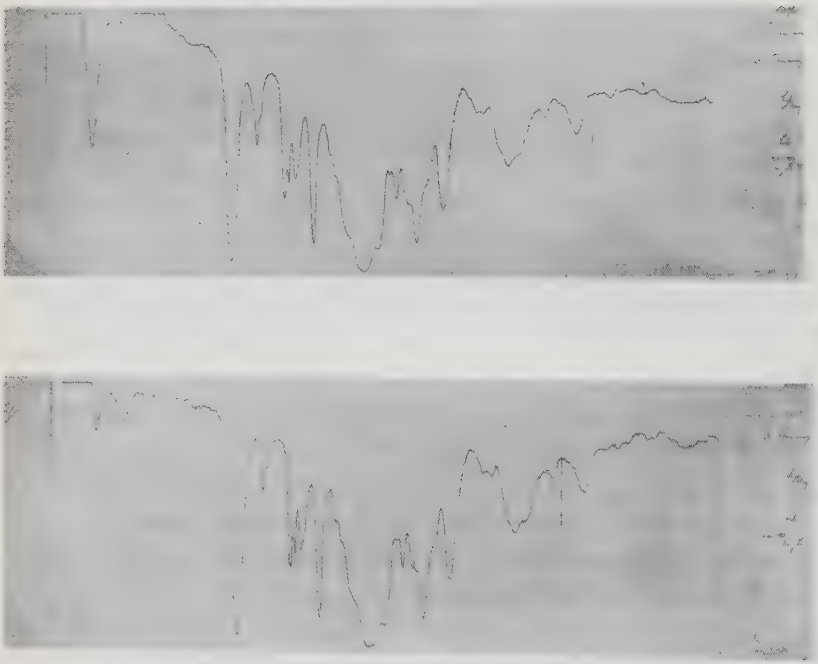


Abb. 17: IR-Spektren der acetylierten Oxydationsprodukte

oben: nichtfermentativ

unten: fermentativ

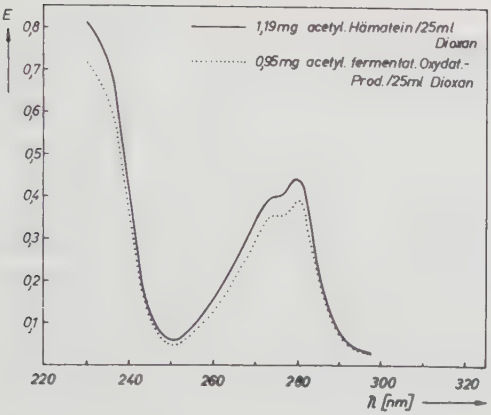


Abb. 18: UV-Spektren der acetylierten Oxydationsprodukte

I : nichtferm. (1,19 mg/25 ml Dioxan)
II : fermentativ (0,95 mg/25 ml Dioxan)

D. Beschreibung der Versuche

1. Reinigung des Hämatoxylins

Das bei den Versuchen verwendete Hämatoxylin wurde aus dem Handel bezogen (Firma E. Merck A.G. Darmstadt). Da es sich beim Lagern auch im trocknen Zustand und im Vakuum langsam unter Bildung von Hämatein rötlich verfärbt, wurde es vor Verwendung umkristallisiert. Hierzu wurde es in 2%-iger Schwefliger Säure heiß gelöst. Beim raschen Abkühlen kristallisierte es in feinen, weißen Nadeln; beim langsamen Abkühlen verdünnter Lösungen bildeten sich größere, leicht gelbliche Kristalle. Sie wurden abfiltriert, mit kalter verdünnter Schwefliger Säure gewaschen und im Exsikkator unter Stickstoff getrocknet (5;24).

Eine Lösung dieses umkristallisierten Hämatoxylins war weiß und zeigte im Gegensatz zur Lösung verunreinigter Substanz nur im UV-Bereich eine Absorption. Eine Absorption bei 445 nm deutet auf eine Verunreinigung durch Hämatein.

2. Darstellung der Phenoloxydase

Die Aufbereitung wurde aus Kartoffeln nach einer modifizierten Vorschrift von F. KUBOWITZ (21) durchgeführt. Die Fermentbereitung setzte sich aus folgenden Arbeitsgängen zusammen:

1. Herstellung des Kartoffelpreßsaftes.
2. Erste Acetonfällung. Der Niederschlag wird abzentrifugiert und verworfen.
3. Zweite Acetonfällung. Der Niederschlag wird abzentrifugiert. Er enthält das Ferment.
4. Anschwemmen des Niederschlages mit Wasser und anschließendes Zentrifugieren. Die Lösung enthält das Ferment.
5. Erste Ammonsulfatfällung. Der Niederschlag wird in der Tiefkühlzentrifuge abzentrifugiert und verworfen.

6. Zweite Ammonsulfatfällung. Es wird wie bei Punkt 5 verfahren; nur enthält der Niederschlag das Ferment.
7. Extrahieren des Niederschlages mit Wasser. Die Lösung enthält das Ferment.
8. Die Fermentlösung wird zur Entfernung des Ammonsulfats dialysiert. Der Bodensatz wird in der Tiefkühlzentrifuge abzentrifugiert.
9. Die Lösung wird der Gefriertrocknung x) unterworfen.

Die Arbeiten erfolgten größtenteils im Kältelabor bei ca. 1°C; es wurde jegliche Berührung der fermenthaltigen Extrakte mit Metallen vermieden. Um nicht einen größeren Aktivitätsverlust zu haben, wurden alle Arbeiten bis zur Dialyse innerhalb eines Tages ausgeführt.

64 mg Trockenferment entsprachen 10 ml Stammlösung. 1 mg Trockenferment hatte 8,5 Cresolase-Einheiten (25). Lagerungsversuche eines solchen Trockenferments bei 1°C haben ergeben, daß ein Aktivitätsverlust erst nach einigen Monaten auftritt.

Für die einzelnen Versuche wurde die Stammlösung wie angegeben verdünnt.

2. Manometrische Messungen

Die manometrischen Messungen erfolgten in der WARBURG-Apparatur (26). Für sämtliche Versuche wurde Zitronensäure-Phosphatpuffer nach McILVAINE verwendet (27). Die Versuchstemperatur betrug 25°C.

Zur Berücksichtigung des Druckausgleiches liefen bei allen Meßreihen jeweils zwei Gefäße mit. In ihnen war die zu oxydierende Substanz weggelassen. Vor Durchführung der Messungen wurde ein Temperaturausgleich von 10 Minuten vorgenommen. Dadurch bedingt, hätte sich eine Verfälschung der Meßergebnisse der Autoxydation ergeben, da der Sauerstoffverbrauch dieser Minuten nicht erfaßt worden wäre.

---

x) Die Gefriertrocknung des Ferments wurde dankenswerterweise von der Fa. Schering A.G. Berlin durchgeführt.

Zur Umgehung dieser Schwierigkeiten wurde daher folgendermaßen verfahren:

Das Hämatoxylin wurde in einem Teil der Zitronensäurestammlösung des Puffers gelöst und in die Seitenbirne des WARBURG-Gefäßes gefüllt. Der restliche Anteil des Puffers (Rest der Zitronensäure + Phosphatanteil) befand sich im Hauptgefäß. Nach dem Temperaturausgleich wurde die Substratlösung aus der Seitenbirne in das Reaktionsgefäß gekippt, der Hahn geschlossen und mit dem Schütteln begonnen. Die Schüttelfrequenz betrug 120 Schwingungen pro Minute. Die Ablesung erfolgte in den ersten 20 Minuten alle 2 Minuten, danach alle 4 Minuten. Der erste Meßwert wurde als Nullwert gesetzt, da sich bei fast allen Versuchen innerhalb der ersten 2 minuten ein Druckanstieg ergab. Bei den Messungen der fermentativen Oxydation wurde in gleicher Weise verfahren. Die Fermentlösungen wurden hierbei von vornherein in den Hauptraum der Reaktionsgefäße gegeben, während das Substrat sich in der Seitenbirne befand.

4. Papierchromatographie

Die Untersuchungen wurden auf Schleicher und Schüll-Papier 2043 bM im absteigenden Verfahren durchgeführt. Als Fließmittel wurde ein modifiziertes Partridgegemisch von Butanol/Eisessig/Wasser (4+1+1) verwendet. Die mittlere Temperatur betrug beim Chromatographieren 20°C. Unter Einhaltung dieser Versuchsbedingungen hatte Hämatoxylin einen Rf-Wert von 0,5.

1 γ Hämatoxylin konnte nach Besprühen mit alkoholischer Kalilauge, wobei eine Blaufärbung erfolgte, noch gut nachgewiesen werden.

5. Dünnschichtchromatographie

Die Untersuchungen wurden auf Celluloseschichten durchgeführt. Die 20x20 cm großen Glasplatten wurden folgendermaßen präpariert:

15 g Cellulosepulver Mn 300 G (Fa. E. Merck, Darmstadt) wurden mit 90 ml Wasser 45 Sekunden lang mit einem ESGE-Stab glatt verrührt und mit dem Streichgerät (Fa. Desaga Heidelberg) gleichmäßig auf die Glasplatten aufgetragen. Anschließend wurden sie 12 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet.

Auch bei diesen Untersuchungen erwies sich ein Gemisch von Butanol/Eisessig/Wasser (4+1+1) als geeignetes Fließmittel. Bei einer Laufstrecke von 10 cm hatte bei 20°C Hämatoxylin einen mittleren Rf-Wert von 0,59. Das Sichtbarmachen erfolgte durch Anfärben mit alkoholischer Kalilauge. Auf diese Weise konnten noch 0,05 γ Hämatoxylin bzw. Hämatein nachgewiesen werden. Bei den durchgeführten Untersuchungen wurde eine Gesamtstoffmenge von 0,5 γ aufgetragen. Diese Menge wurde ohne Schwanzbildung scharf getrennt und gewährleistete bereits den Nachweis gebildeter Oxydationsprodukte von geringer Konzentration.

6. Spektralphotometrie

Die Messungen wurden zum Teil in einem Zeiss-Spektralphotometer PMQ II bzw. einem selbstregistrierenden Beckman-Spektralphotometer DK-1A in Zitronensäure-Phosphatpuffer (sofern nicht anders angegeben) durchgeführt. Es wurden 1 cm Quarzküvetten verwendet.

7. IR-Spektralphotometrie

Die Substanzen wurden in KBr gepreßt und im Perkin-Elmer-Spektralphotometer Nr 21 von der Fa. Schering A.G. Berlin aufgenommen.

8. Molekulargewichtsbestimmungen

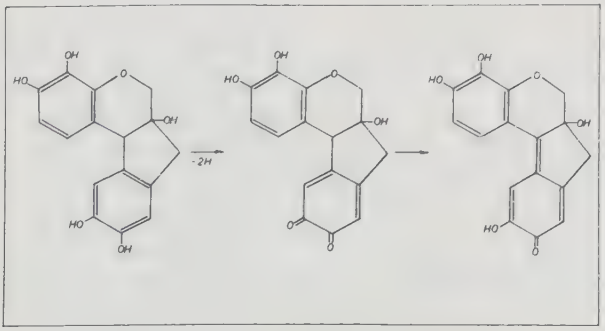
Die Molekulargewichte wurden im Dampfdruck-Osmometer Modell 301 A (Mechrolab Inc., Calif.) bestimmt. Die Substanzen wurden in Dioxan gelöst.

9. Elementaranalysen

Die Elementaranalysen wurden im Mikroanalytischen Laboratorium A. Bernhardt, Mühlheim/Ruhr durchgeführt.

E. Zusammenfassung

Die in der Einleitung gestellten Fragen im Hinblick auf die fermentative Oxydation des Hämatoxylins können durch die erhaltenen Meßergebnisse, Analysen und Spektren als gelöst betrachtet werden. Es kann mit Sicherheit festgestellt werden, daß die Oxydation des Hämatoxylins durch Phenoloxydase katalysiert wird. Die Reaktionsgeschwindigkeit ist wie bei allen Fermentreaktionen pH-abhängig. Sie wird weiterhin durch die Konzentration von Substrat und Ferment beeinflußt. Ascorbinsäure wird im System Ferment/Hämatoxylin oxydiert. Es muß daher primär ein o-Chinon gebildet werden, daß sich in einer Sekundärreaktion in die p-chinoide Struktur des Hämateins umwandelt. Diese ist wahrscheinlich die energieärmere und damit die beständigere Form. Das gebildete erste fermentative Oxydationsprodukt wurde isoliert. Es erwies sich als identisch mit dem auf autoxydativem Wege dargestellten und bereits bekannten Hämatein. Es läßt sich demzufolge für diese Reaktion folgendes Schema aufstellen:



Weiterhin konnte nachgewiesen werden, daß auch das Hämatein fermentativ oxydiert wird. Ob diese Oxydation am Ring A

zum o-Chinon erfolgt, was nach unseren Kenntnissen über durch Phenoloxydase katalysierte Reaktionen durchaus möglich wäre, konnte mit Sicherheit noch nicht geklärt werden.

F. Literaturverzeichnis

1 M. CHEVREUL, Ann. Chimie 66, 225 (1808)
2 M. CHEVREUL, Ann. Chimie 82, 54, 126 (1810)
3 C. LIEBERMANN und O. BURG, Chem. Ber. 9, 1883 (1876)
4 O.L. ERDMANN, J. prakt. Chem. 26, 193 (1842)
ref. C. 13, 579 (1842)
5 O. HESSE, Liebigs Ann. Chem. 109, 332 (1859)
6 A. WERNER und P. PFEIFFER, Chem. Ztschr. 3, 390, 420 (1904)
ref. BEILSTEIN's Handbuch der organ. Chemie, 4.Aufl. 1933, Bd. 17, 194
7 W.H. PERKIN und R. ROBINSON, J. chem. Soc. 93, 496 (1908)
8 F. MORSINGH und R. ROBINSON, Int. Congress of Pure and Applied Chemistry, Zürich 1953
ref. Bull. Soc. chim. France, Mém. 125 (1958)
9 O. DANN und A. HOFFMANN, Angew. Chem. 75, 1125 (1963)
10 D. KEILIN und T. MANN, Proc. Roy. Soc. (London) Ser. B. 125, 187 (1938)
11 H.S. MASON, Advances in Enzymol. 19, 134 (1957)
12 O. HOFFMANN-OSTENHOF, Advances in Enzymol. 14, 219 (1953)
13 C.F. SCHÖNBEIN, J. prakt. Chem. 81, 259 (1860)
ref. BEILSTEIN's Handbuch der organ. Chemie, 4.Aufl. 1933, Bd. 17, 219
14 F. REIM, Chem. Ber. 4, 329 (1871)
15 E. ENGELS, W.H. PERKIN und R. ROBINSON, J. chem. Soc. 93, 1140 (1908)
16 W. BRACKMANN und E. HAVINGA, Recueil Trav. chim. Pays-Bas 74, 1100 (1955); ref. C. 14281 (1958)
17 G.C. LALOR und S.L. MARTIN, J. Soc. Dyers Colourists 75, 520 (1959)
18 B.J. MAC NULTY und G.J. HUNTER, Analytica chim. Acta 9, 428 (1953)
19 Ref.(18) S. 426
20 Ref.(17) S. 516

21 F. KUBOWITZ, Biochem. Z. 292, 221 (1937); 299, 32 (1938)
22 Ref.(17) S. 521
23 P. ENGELS, W.H. PERKIN und R. ROBINSON, J. chem. Soc. 93, 1115 (1908)
24 E. ERDMANN u.a., J. chem. Soc. 81, 236 (1902)
25 M. GRAUBARD und J.M. NELSON, J. biol. Chemistry 111, 757 (1935)
26 B. BAMANN und K. MYRBÄCK, Methoden der Fermentforschung, Georg Thieme Verlag, Leipzig 1941, Bd. 2, 987
27 ibid, Bd. 1, 786 ff.

Lebenslauf

Am 3. November 1933 wurde ich als Sohn des Apothekers Robert Heinrichs und seiner Ehefrau Elisabeth, geb. Walter, in Königsberg/Pr. geboren. Im März 1954 bestand ich an der Albrecht Dürer Schule in Berlin-Neukölln das Abitur.

Von 1954 - 1956 war ich Praktikant in der Handjery-Apotheke in Berlin-Neukölln. Nach bestandenem Vorexamen begann ich im Sommersemester 1956 das Pharmaziestudium an der Freien Universität Berlin. Ich legte dort im Mai 1959 mein Staatsexamen ab. Im Herbst desselben Jahres begann ich mit meiner Doktorarbeit.

Ulrich Heinrichs